

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



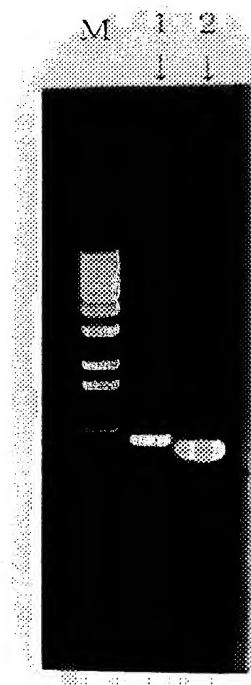
(51) 国際特許分類6 C07K 16/18, 16/28, C12N 5/20, A61K 39/395 // C12P 21/08, C12N 15/06	A1	(11) 国際公開番号 WO99/12973
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/04118		(43) 国際公開日 1999年3月18日(18.03.99)
(22) 国際出願日 1998年9月11日(11.09.98)		
(30) 優先権データ 特願平9/264853 1997年9月11日(11.09.97)	JP	(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ヨーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 歐州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo, (JP)		
(72) 発明者 ; および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 福島 直(FUKUSHIMA, Naoshi)[JP/JP] 宇野慎介(UNO, Shinsuke)[JP/JP] 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門一丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP)		
(74) 代理人 弁理士 長谷川芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6F 創英國際特許事務所 Tokyo, (JP)		

(54)Title: MONOClonal antibody inducing apoptosis

(54)発明の名称 アポトーシスを誘起するモノクローナル抗体

(57) Abstract

A monoclonal antibody which is an antibody specifically recognizing human integrin associated proteins and is an antigen inducing the apoptosis of nucleated blood cells having the human integrin associated proteins. Therefore, it is useful as an antibody, which specifically recognizes the human integrin associated proteins, in discriminating and identifying these proteins. Owing to the effect of inducing the apoptosis of nucleated blood cells, the above antibody is also usable as remedies, etc. in the fields of, for example, treating myelocytic leukemia and lymphatic leukemia.



本発明のモノクローナル抗体は、ヒト Integrin Associated Proteinを特異的に認識する抗体であり、ヒト Integrin Associated Proteinを有する有核血液細胞にアポトーシスを引き起こす抗原である。従って、ヒト Integrin Associated Proteinを特異的に認識する抗体として、これらを識別、同定するのに有用であると共に、有核血液細胞にアポトーシスを引き起こす作用を有することから、当該特性を利用して、骨髄性白血病およびリンパ系白血病の治療等の分野において有用な治療薬剤等として使用し得るものである。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL アルバニア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AT オーストリア	GA ガボン	LS レソト	SL シエラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スウェーデン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BB バルバドス	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴー
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドavia	TJ タジキスタン
BF ブルガリア	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BG ブルガリア	GW ギニア・ビサオ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BJ ベナン	GR ギリシャ	共和国	TT トリニダッド・トバゴ
BR ブラジル	HR クロアチア	ML マリ	UA ウクライナ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UG ウガンダ
CA カナダ	ID インドネシア	MR モーリタニア	US 米国
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MW マラウイ	UZ ウズベキスタン
CG コンゴ	IL イスラエル	MX メキシコ	VN ヴィエトナム
CH スイス	IN インド	NE ニジェール	YU ユーゴースラビア
CI コートジボアール	IS アイスランド	NL オランダ	ZW ジンバブエ
CM カメルーン	IT イタリア	NO ノルウェー	
CN 中国	JP 日本	NZ ニュージーランド	
CU キューバ	KE ケニア	PL ポーランド	
CY キプロス	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
CZ チェコ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DE ドイツ	KR 韓国	RU ロシア	
DK デンマーク	KZ カザフスタン	SD スーダン	
EE エストニア	LC セントルシア	SE スウェーデン	
ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール	

明細書

アポトーシスを誘起するモノクローナル抗体

技術分野

本発明は、 Integrin Associated Protein (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起する特性を有する新規モノクローナル抗体、ならびにその断片、ペプチドおよび低分子化合物、および当該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに関する。当該新規抗体は、骨髓性白血病およびリンパ性白血病の治療薬等として有用である。

背景技術

従来、顆粒球コロニー刺激因子、例えば、遺伝子組換え型顆粒球コロニー刺激因子 (rG-CSF) は、主に顆粒球系細胞の分化、増殖を促進させる液性因子として知られている。また、マウスの *in vivo* の実験に基づき、当該 rG-CSF を投与することにより、骨髓の造血亢進のみならず、脾臓でも著しい髄外造血が起こり造血幹細胞を始めとしてすべての造血前駆細胞が脾臓で増殖することが報告されている。係る脾臓での髄外造血のメカニズムとして、rG-CSF の刺激により脾臓の造血微小環境が変化し、造血支持能力が亢進したことにより造血が生じたものであると考えられた。

そこで、本発明者は、当該脾臓での造血機能を解明するため、rG-CSF 連投後の脾臓の間質細胞に着目し、間質細胞を介した rG-CSF による造血機能亢進の解析を試みるべく、rG-CSF を連投したマウス脾臓より造血間質細胞株 (CF-1 細胞) を樹立し、係る造血間質細胞を用いてその造血支持能を検討したところ、*in vitro* でのコロニー刺激活性および *in vivo* での造血幹細胞支持能を認めた [Blood, 80, 1914 (1992)]。

しかし、当該脾臓間質細胞については、その一部が細胞株 (CF-1 細胞) として樹立され、その細胞学的特性の検討等はなされているが、当該細胞表面抗原を認識する特定の抗体を作製することは全く行われておらず、ましてやその特性

等については未だ全く知られていなかった。

発明の開示

そこで、本発明者は、脾臓間質細胞に関する前記知見と、従来の研究結果を踏まえ、脾臓間質細胞を識別し得る特定の抗体を開発することを目標として銳意研究し、当該脾臓間質細胞株を感作抗原とするモノクローナル抗体の作製を試み、新規モノクローナル抗体を取得することに成功した。

さらに、前記取得されたモノクローナル抗体の特性について検討し、当該モノクローナル抗体は、骨髓系細胞にアポトーシスを誘起する特性を有するものであることを見い出した。以下、当該モノクローナル抗体をBMAP-1抗体と命名し、使用する。

さらに、前記BMAP-1抗体が認識する抗原について検討し、直接発現クローニング (Direct Expression Cloning) により、マウスIntegrin Associated Protein (マウスIAP) (Genbank、Accession Number Z25524) であることを見出した。

さらに、前記BMAP-1抗体の作用を、マウスIAPを遺伝子導入した組み換え体細胞を用いて検討した。すなわち、マウスIAPを発現していないJurkat細胞に、常法によりマウスIAP遺伝子を導入し、マウスIAPを発現する細胞株 (Recombinant Jurkat Cell) を作製し、BMAP-1抗体の当該マウスIAP発現細胞に対する作用をMTS法およびフローサイトメトリーによるDNA断片化の検索により検討した (特願平9-67499)。

以上の知見に基づき、ヒトのIntegrin Associated Protein (以下ヒトIAPとする; J. Cell Biol., 123, 485-496, 1993にアミノ酸配列および塩基配列は記載; Journal of Cell Science, 108, 3419-3425, 199

5) を抗原とするモノクローナル抗体は、当該抗原を発現する有核血液細胞（骨髓系細胞およびリンパ球）にアポトーシスを誘起する効果があるとの予想に基づき、本発明者は、ヒト Integrin Associated Protein を抗原としてモノクローナル抗体の作製を試み、当該抗原を有するヒト有核血液細胞にアポトーシスを誘起するモノクローナル抗体を得ることに成功した。

すなわち、本発明は、ヒトの Integrin Associated Protein (ヒト IAP) を有する有核血液細胞（骨髓系細胞およびリンパ球）にアポトーシスを誘起させる特性を有する新規モノクローナル抗体およびその断片、更には、当該モノクローナル抗体を産生させるハイブリドーマを提供することを目的とするものである。

係る新規モノクローナル抗体は、骨髓性白血病およびリンパ性白血病の治療薬等として有用である。

さらに、Integrin Associated Protein の機能としては、インテグリンの $\alpha V \beta 3$ の β 鎖に結合し $\alpha V \beta 3$ とそのリガンド (Ligand) であるビトロネクチン (Vitronectin) との結合を支持する作用 (J. Cell. Biol., 123, 485-496 (1993))、好中球と血管内皮との接着に際し血管内皮に Ca^{2+} の流入を誘導する作用 (J. Biol. Chem., 268, 19931-19934 (1993))、あるいは好中球が血管内皮を通過することを支持する作用が報告されているが (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 3978-3982 (1995))、有核血液細胞についてのアポトーシスに関する機能は報告されていない。

すなわち、本発明に係るモノクローナル抗体は、ヒト Integrin Associated Protein を特異的に認識する抗体である。従って、ヒト Integrin Associated Protein の識別、及び同定する機能を有するものである。

さらに、本発明のモノクローナル抗体は、ヒト Integrin Associated Proteinを有する有核血液細胞（骨髓系細胞およびリンパ球）のアポトーシスを誘起する特性を示す抗体である。ここで、アポトーシス（apoptosis）とは、核クロマチンDNAがヌクレオソーム単位で切断（いわゆるラダー・フォーメーション）され、その結果、細胞を死に至らしめる現象で、細胞自滅とも云われる現象である。

従来、有核血液細胞（骨髓系細胞およびリンパ球）にアポトーシスを誘起する特性を有するモノクローナル抗体として知られているものに、抗Fas抗体（Cell, 66, 233-243, 1991）、抗CD43抗体（Blood, 86, 502-511, 1995）、抗HLA Class I α 1 Domain（Blood, 90, 726-735, 1997）抗体等があるが、本発明に係る、Integrin Associated Proteinを認識する抗体が有核血液細胞にアポトーシスを誘起する特性については全く知られていない。従つて、本発明に係るモノクローナル抗体は、Integrin Associated Proteinを特異的に認識可能な抗体であり、また、Integrin Associated Proteinを有する有核血液細胞（骨髓系細胞およびリンパ球）にアポトーシスを誘起する特性を有するすべてのモノクローナル抗体を包括するものとして定義される。

さらに、本発明に係る抗体は、すべての有核血液細胞にアポトーシスを誘起するもののみには限定されない。少なくとも一種の有核血液細胞にアポトーシスを誘起するものも含まれる。具体的には、骨髓性白血病ならば少なくとも骨髓系細胞にアポトーシスを誘起すればよい。

より詳しくは、本発明は、Integrin Associated Protein (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシス (apoptosis) を誘起するモノクローナル抗体を提供するものである。

さらに、本発明は、Integrin Associated Protein

n (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシス (apoptosis) を誘起するモノクローナル抗体断片、ペプチド、および低分子化合物を提供するものである。

また、本発明は、上記のモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマを提供するものである。
5

さらに、本発明は、IAPに結合してIAPの作用を亢進させ、有核血液細胞にアポトーシスを誘起する物質を含有する抗白血病治療剤を提供するものである。

また、本発明は、上記の物質がモノクローナル抗体であることを特徴とする抗白血病治療剤を提供するものである。

さらに、本発明は、上記の物質がモノクローナル抗体断片、ペプチド、低分子化合物であることを特徴とする抗白血病治療剤を提供するものである。
10

図面の簡単な説明

図1は、HL—60細胞株のmRNAより作製したcDNAからPCR法で增幅したヒトIAPのバンドを示す電気泳動写真である。左側より分子量マーカー (M)、ヒトIAP (1)、βアクチン (2) を示す。
15

図2は、ヒトIAPを発現させたL1210細胞の抗CD47抗体によるヒトIAPの発現量を示す図である。ピークは、対照としてpCOS1のみを遺伝子導入したL1210細胞を示す。

図3は、ヒトIAPを発現させたL1210細胞の抗CD47抗体によるヒトIAPの発現量を示す図である。ピークは、ヒトIAP遺伝子を導入したL1210細胞で明らかにヒトIAPの発現量が増加していることを示す。
20

図4は、免疫マウスでの抗体価を示す図である。左側のピークは、Intact L1210細胞。右側のピークはヒトIAPを発現させたL1210細胞であり、細胞融合に供したマウスの血清は明らかにヒトIAPを認識していることを示す。
25

図5は、ハイブリドーマの培養上清を用いての増殖抑制実験 (Jurkat

細胞) を示す図である。

図6は、ハイブリドーマの培養上清を用いての増殖抑制実験 (A R H 7 7 細胞) を示す図である。

図7は、培養上清によるJ u r k a t 細胞に対するアポトーシス誘起作用 (P I 染色による解析) を示す図であり、対照とした8 G 2 の培養上清の場合の結果を示す。R 1 はアポトーシスの比率 (%) を示し、7. 4 3 %である。

図8は、培養上清によるJ u r k a t 細胞に対するアポトーシス誘起作用 (P I 染色による解析) を示す図であり、7 D 2 - E 3 の場合の結果を示す。R 1 はアポトーシスの比率 (%) を示し、9. 8 4 %である。

図9は、培養上清によるJ u r k a t 細胞に対するアポトーシス誘起作用 (P I 染色による解析) を示す図であり、1 1 C 8 の場合の結果を示す。R 1 はアポトーシスの比率 (%) を示し、1 5. 3 2 %である。

図10は、培養上清によるH L - 6 0 細胞に対するアポトーシス誘起作用 (P I 染色による解析) を示す図であり、対照とした8 G 2 の培養上清の場合の結果を示す。M 1 はアポトーシスの比率 (%) を示し、6. 9 4 %である。

図11は、培養上清によるH L - 6 0 細胞に対するアポトーシス誘起作用 (P I 染色による解析) を示す図であり、1 1 C 8 の場合の結果を示す。M 1 はアポトーシスの比率 (%) を示し、1 2. 1 6 %である。

図12 Aは、KM - 1 0 2 とH L - 6 0 細胞との共培養系でのアポトーシスの解析 (T U N E L 法) であり、対照として9 C 5 の培養上清を用いた結果を示す白黒顕微鏡写真である。ここで、アポトーシスの細胞は黒又は褐色に染色される。核染色はメチルグリーンで行い、倍率は1 0 0 倍である。

図12 Bは、KM - 1 0 2 とH L - 6 0 細胞との共培養系でのアポトーシスの解析 (T U N E L 法) であり、対照として9 C 5 の培養上清を用いた結果を示すカラー顕微鏡写真である。ここで、アポトーシスの細胞は黒又は褐色に染色される。核染色はメチルグリーンで行い、倍率は1 0 0 倍である。

図13Aは、KM—102とHL—60細胞との共培養系でのアポトーシスの解析（TUNEL法）であり、11C8の培養上清を用いた結果を示す白黒顕微鏡写真である。TUNEL陽性細胞が図12より多数認められる。ここでアポトーシスの細胞は黒又は褐色に染色される。核染色はメチルグリーンで行い、倍率は100倍である。

図13Bは、KM—102とHL—60細胞との共培養系でのアポトーシスの解析（TUNEL法）であり、11C8の培養上清を用いた結果を示すカラー顕微鏡写真である。TUNEL陽性細胞が図12より多数認められる。ここでアポトーシスの細胞は黒又は褐色に染色される。核染色はメチルグリーンで行い、倍率は100倍である。

図14は、ハイブリドーマ株7D2-E3および11C8より精製されたIgGをSDS・PAGEにより解析した結果を示す電気泳動写真である。分子量マーカー（M、M'）、非還元条件でのマウスIgG（標品）（1）、7D2-E3（2）、11C8（3）、還元条件でのマウスIgG（標品）（4）、7D2-E3（5）、11C8（6）を示す。

図15は、HL—60細胞を用い、CD47の発現をフローサイトメトリーにより解析した結果を示す。

図16は、Jurkat細胞を用い、CD47の発現をフローサイトメトリーにより解析した結果を示す。

図17は、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞（L1210-hIAP）を用いた（72時間インキュベーション）アポトーシス惹起作用を示すためのコントロールとして、mIgG（10μg/ml）の結果を示す。

図18は、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞を用いた（72時間インキュベーション）、MABL-1（10μg/ml）のアポトーシス惹起作用を示す。

図19は、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞を用いた（72時間

インキュベーション)、MABL-2 (10 μg/ml) のアポトーシス惹起作用を示す。

図20は、Jurkat細胞を用いた(48時間インキュベーション)、アポトーシス惹起作用を示すためのコントロールとして、mIgG (10 μg/ml) の結果を示す。

図21は、Jurkat細胞を用いた(48時間インキュベーション)、MABL-1 (10 μg/ml) のアポトーシス惹起作用を示す。

図22は、Jurkat細胞を用いた(48時間インキュベーション)、MABL-2 (10 μg/ml) のアポトーシス惹起作用を示す。

図23は、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞(L1210-hIAP)を用いた(72時間インキュベーション)アポトーシス惹起作用を示すためのコントロールとして、mIgG (10 μg/ml) の結果を示す。

図24は、Fab化したMABL-2 (10 μg/ml)について、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞に対するアポトーシス惹起作用を示す。

図25は、Fab化したMABL-2抗体のSDS電気泳動写真を示す。

図26は、MABL-2で処置した場合に生存期間が顕著に延長したことを示す。

図27は、実施例5(2)におけるELISAの結果を示す。

図28は、F(ab')2化したMABL-2を処置した場合に生存期間が顕著に延長したことを示す。

図29は、F(ab')2化したMABL-1抗体、及びMABL-2抗体のSDS電気泳動写真を示す。

図30は、MABL-1およびMABL-2を処置した群において、血中ヒトIgG濃度について見られる顕著な抑制、殺腫瘍効果を示す。

発明を実施するための最良の形態

モノクローナル抗体の作製

本発明のモノクローナル抗体は、一般的には次のようにして作製することができる。すなわち、本発明のモノクローナル抗体は、例えば、ヒト Integrin Associated Proteinを感作抗原とし、当該抗原を通常公知の免疫法を応用して免疫し、通常公知の細胞融合法を応用して細胞融合させ、
5 通常公知のクローン化法を応用してクローン化することにより可能である。

本発明のモノクローナル抗体の作製方法には、より具体的には、例えば、前記感作抗原として、ヒト Integrin Associated Proteinをマウス白血病細胞株L 1210細胞に発現させた組み換え体細胞を使用し、当該感作抗原で免疫した哺乳動物の形質細胞（免疫細胞）を、マウス等の哺乳動物
10 のミエローマ細胞と融合させ、得られた融合細胞（ハイブリドーマ）をクローン化し、その中から前記細胞株を認識する本発明の抗体を產生するクローンを選別し、これを培養して目的とする抗体を回収する方法が好適なものとして例示される。

なお、本発明においては、上記方法はあくまで一例に過ぎず、例えば、この場合、前記感作抗原としては、前記L 1210組み換え体細胞に限らず、ヒト Integrin Associated Protein (IAP) そのもの、あるいは可溶化型のヒト IAPを使用することも適宜可能であり、前記L 1210組み換え体細胞の場合と同様にして、目的とする有核血液細胞（骨髓系細胞およびリンパ球）にアポトーシスを誘起するモノクローナル抗体を作製することが可能である。
20

また、当該抗体の cDNAライブラリーからファージ・ディスプレイ法を用いて目的とするモノクローナル抗体を作製することも可能である。

このようなモノクローナル抗体の作製方法において、前記感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用するミエローマ細胞との適合性などを考慮して選択するのが好ましく、一般的には、マウス、ラット、ハムスター等が好適なものとして使用される。
25

また、免疫は、一般的方法により、例えば、前記ヒト Integrin Associated Proteinを発現するL1210組み換え細胞等を哺乳動物に腹腔内注射等により投与することに好ましく実施可能である。より具体的には、PBSや生理食塩水等で適当量に希釀、懸濁したものを、動物に10日毎に数回投与することが好ましい。免疫細胞としては、前記細胞株の最終投与後に摘出した脾細胞を使用するのが好ましい。

次に、前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞としては、すでに公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3X63Ag8.653) [J. Immunol., 123, 1548 (1978)]、P3-U1 [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978)]、NS-1 [Eur. J. Immunol., 6, 511-519 (1976)]、MPC-11 [Cell, 8, 405-415 (1976)]、Sp2/0-Ag14 [Nature, 276, 269-270 (1978)]、FO [J. Immunol. Methods, 35, 1-21 (1980)]、S194 [J. Exp. Med., 148, 313-323 (1978)]、およびR210 [Nature, 277, 131-133 (1979)] 等が好適に使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には通常の方法、例えば、ミルシュタインら (Milstein et al.) の方法 [Methods Enzymol., 73, 3-46 (1981)] 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は、例えば、融合促進剤の存在下に通常の栄養培地中で実施される。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等が使用され、更に、所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を適宜添加使用することもできる。免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に

対して、免疫細胞を1～10倍程度とするのが好ましい。また、前記細胞融合に用いる培地としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI-1640培地、MEM培地、その他、この種の細胞培養に使用される通常の培地が使用可能であり、更に、牛胎児血清(FBS)等の血清補液を併用することも可能である。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培地内でよく混合し、予め37°C程度に加温したPEG溶液、例えば、平均分子量1,000～6,000程度のPEGを、通常、培地に約30～60% (W/V) の濃度で添加し、混合することによって行われる。続いて、適当な培地を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことにより目的とするハイブリドーマが形成される。

当該ハイブリドーマは、通常の選択培地、例えば、HAT培地(ヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジンを含む培地)で培養することにより選択される。当該HAT培地による培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞(未融合細胞)が死滅するのに充分な時間、通常、数日～数週間継続する。次いで、通常の限界希釈法に従って、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローン化が実施される。

このようにして作製される本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培地で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマから本発明のモノクローナル抗体を採取するには、当該ハイブリドーマを常法に従って培養し、その培養上清から得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に投与して増殖させその腹水から得る方法など適宜の方法が採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るために適した方法であり、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適した方法である。

更に、前記した方法により得られる抗体は、塩析法、ゲルfiltration法、アフィニティ

イークロマトグラフィー等の通常の精製手段を応用して高純度に精製することができる。

モノクローナル抗体断片

本発明に係るモノクローナル抗体は、上記説明した抗体の全部でもまた、その一部であってもよい。すなわち、本発明に係るモノクローナル抗体の一部であって、さらには、ヒト Integrin Associated Protein を特異的に認識するものであり、また、ヒト Integrin Associated Protein を有する有核血液細胞（骨髄系細胞およびリンパ球）にアポトーシスを惹起するものであればよい。係る断片は例えば、Fab、F(ab')_n、Fab' が挙げられる。さらに、係る断片の作製はパパイン、ペプシン、フィシン等の酵素消化により可能である。得られた断片の特性は上記説明した同様の方法で確認可能である。

モノクローナル抗体と同様の作用を有するペプチドおよび低分子化合物

上記モノクローナル抗体は、ヒト Integrin Associated Protein を認識し、有核血液細胞にアポトーシスを誘起するが、同様に IAP を認識し、有核血液細胞にアポトーシスを誘起するペプチドおよび低分子化合物も包含するものである。

本発明のモノクローナル抗体の特性

本発明のモノクローナル抗体は、後記する実施例において具体的に示されるように、ヒト Integrin Associated Protein を特異的に認識するものである。

さらに、本発明のモノクローナル抗体はヒト Integrin Associated Protein を有する有核血液細胞（骨髄系細胞およびリンパ球）

にアポトーシスを惹起するものである。

また、係る特性を利用することにより、骨髓性白血病およびリンパ性白血病の治療等の分野において有用な治療薬剤等として使用し得るものである。

すなわち、本発明のモノクローナル抗体を利用して有核血液細胞にアポトーシスを引き起こす抗原等を特異的に認識する抗体として、これらを識別、同定するための、あるいは、当該モノクローナル抗体の固有の特性を利用して骨髓性白血病およびリンパ性白血病治療薬剤等として使用するための具体的システムの構築、その改変および応用等は、当業者にとって自明の通常の方法を応用して実施されるものである限り、いずれも本発明の範囲に含まれるものであることは云うまでもない。

抗白血病治療剤

本発明に係る抗白血病治療剤は、IAPの作用が本発明に係る抗体等の結合により亢進することに基づくものである。また、本発明に係る抗体の投与量については特に制限はないが、 $5 \mu\text{g} - 500 \text{mg}/\text{kg}$ の範囲であることが好ましい。

実施例

次に、本発明を実施例に基づいて更に具体的に説明するが、本発明は当該実施例に限定されるものではない。

実施例 1 (モノクローナル抗体の作製)

(1) 感作抗原と免疫法

感作抗原として、DBAマウス由来の白血病細胞株L1210細胞 (ATCC
株番号CCL-219, J. Natl. Cancer Inst. 10:179
-192, 1949) にヒトIntegrin Associated Protein (IAP) を高発現した細胞株を用いて抗原感作を行った。

ヒトIAPの遺伝子は、HL-60細胞株のmRNA (CLONTECH社
製) より作製したcDNAを鑄型としてヒトIAP特異的な塩基配列を持つプラ

イマー（センス・プライマーとしては、G C A A G C T T A T G T G G C C C C T G G T A G C G を、アンチセンス・プライマーとしては、G C G G C C G C T C A G T T A T T C C T A G G A G G を使用した。）を用いたPCRによりヒトIAPを増幅した（図1）。

このPCR産物をクローニングベクターp GEM-T vector（プロメガ社製）に組み込み大腸菌JM109（タカラ社製）にトランスフォーメーションし、Insert DNAの塩基配列をDNAシークエンサー（373A DNA sequencer, ABI社製）にて確認後、発現ベクターp COS1に組み換えた。

発現ベクターp COS1は、p E F - B O S (Nucleic Acids Research, 18, 5322, 1990) のデリバティブであり、ヒトエロングーション・ファクター-1 α をプロモーター／エンハンサーとして使用しネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだベクターである。このヒトIAPを組み込んだ発現ベクターをL1210細胞株にDMRIE-C(GIBCO-BRL社製)を用いて遺伝子導入しGeneticin（最終濃度1mg/ml, GIBCO-BRL社製）により選択し、さらに、遺伝子が導入されたL1210細胞は限界希釈法により細胞をクローニングした。

得られたクローンについて、ヒトIAPを認識する抗CD47抗体（ファーミンジエン社製）で抗原の発現を検討し、発現量の高いクローンを抗原感作の細胞として選択した（図2, 3）。この組み換え体L1210細胞の培養条件は、10%牛胎児血清（FBS、Moregate社製）、Iscove改変Dulbecco培地（IMDM）（GIBCO-BRL社製）を培地として使用し、5%CO₂インキュベーター中で37°Cの温度条件下で継代培養を行った。

免疫動物としては、L1210細胞と同系マウスであるDBA/2マウス（日本チャールズリバー繁殖）を使用した。抗原感作に使用したヒトIntegrin Associated Protein (IAP)を遺伝子導入したL12

10 細胞は、マイトマイシン-C（協和発酵社製） $200\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で約30分インキュベーションし細胞の増殖を止めた後、マイトマイシン-Cを完全に洗浄し、PBSに懸濁した。

この細胞を約 5×10^6 個の細胞数で約10日前後の間隔で3回上記のマウス腹腔内に注射し免疫した。3回免疫後に眼窩より血液を採取しその血清を1%BSA含有PBSで50倍希釈し、この血清希釈液と抗原感作に用いた組み換え体L1210細胞との結合性をFACScan（ベクトン・ディッキンソン社製）により確認し（図4）、活性の最も高い個体について、4回目の免疫のさらに5日後に約 1×10^7 個細胞を腹腔内に投与し追加免疫を行った。最終免疫4日後にマウスを屠殺して脾臓を摘出した。

（2）細胞融合

上記のマウスから摘出した脾臓を細切後、遊離した脾細胞を遠沈した後、IMDM培地中に懸濁し、浮遊させ、充分に洗浄を行った。一方、マウス・ミエローマ細胞株P3-U1 [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978)]を、10%牛胎児血清（FBS、Moregate社製）を含有するIMDM培地にて培養し、同様に前記IMDM培地で洗浄後、その 1×10^7 個と、前記脾細胞 5×10^6 個とを遠心管に入れ混合し、ポリエチレングリコール4000（半井化学社製）によって常法 [Clin. Exp. Immunol., 42, 458-462 (1980)]に従い細胞融合させた。

次いで、得られた融合細胞を、10%FBSおよび融合細胞の増殖刺激剤（B-M-Condimed H1, ベーリンガー・マンハイム社製）を含むIMDM培地にて懸濁し96個のウエルプレートに分注し、5%CO₂インキュベーター中で37°Cで培養した。翌日にHAT選択培地および増殖刺激剤を含む10%FBS・IMDM培地に置換して培養を継続し、増殖維持させた。

次に、このようにして得られた融合細胞についてその培養上清の機能を白血病

細胞株を用いて検討するため、融合細胞の培地を 10%FBS を含む IMDM 培地に代え、培養を継続し増殖維持させた。

(3) スクリーニング

上記の融合細胞の培養上清を用いて以下のスクリーニングを行った。

5 ① 一次スクリーニング

ヒト Integrin Associated Protein (IAP) の遺伝子を遺伝子導入したマウス脾臓間質細胞株 (CF-1 細胞) (抗原感作に用いたヒト IAP を発現する L1210 細胞を作製する際使用したプラスミドと同一のプラスミドを遺伝子導入し組み換え体細胞とした) を 96 ウェルプレートに 1×10^4 /ウェルで播種し終夜で培養し、その後 2% PLL (periodate-lysine-p paraformaldehyde) により固定し ELSA 用プレートを作製した。このプレートは、洗浄後 1% BSA 溶液にて室温で 1 時間ブロッキングし、さらに洗浄後各種ハイブリドーマの培養上清を $50\mu\text{l}$ 添加し室温で 1 時間インキュベーションした。

10 洗浄後、アルカリリフォスマターゼでラベルした抗マウス IgG+A+M (H + L) (ザイメッド社製) を添加し室温で 1 時間インキュベーションし、洗浄後 SIGMA 104 substrate (シグマ社製) を最終濃度 1mg/ml で添加し室温でインキュベーションし、比活性をマイクロプレート・リーダー (Mode 1 3550, バイオラッド社製) で測定した。

その結果、ハイブリドーマを 2880 ウェルに播種しその内 2089 ウェルにハイブリドーマの出現を確認し 187 ウェルが一次スクリーニングで陽性であった。なお、陰性対照としては、マウス IgG1 を、陽性対照としては抗ヒト CD 47 抗体 (ファーミンジエン社製) をそれぞれ、 $3\mu\text{g/ml}$ 濃度で $50\mu\text{l}$ 添加し室温で 1 時間インキュベーションした。

15 ② 二次スクリーニング

一次スクリーニングで陽性と判定したクローンについて、発現ベクター pCOS1 のみを遺伝子導入した CF-1 細胞を対照として、ヒト Integrin A

ssociated Protein (IAP) を発現する CF-1 細胞を用いての ELISA 系を行うことで、ハイブリドーマが産生する抗体がヒト IAP を特異的に認識するか否かをスクリーニングした。

その結果、一次スクリーニングで陽性と認められた 187 ウェルの内 21 ウェルについて陽性が認められた。これらのうち、7D2 および 11C8 を代表例として、ヒト IAP との特異的結合を ELISA の吸高度で表 1 に示した。

(表 1) ハイブリドーマ培養上清のヒト IAP に対する特異的結合の ELISA での解析

	<Raw data>	PBS	α hCD47	7D2	11C8
		3 μ g/ml			
	CF1-pCOS1	0.185	0.160	0.189	0.149
	CF1-hIAP-55-8	0.192	0.456	0.568	0.812

	<Subtracted>	PBS	α hCD47	7D2	11C8
		3 μ g/ml			
	Specific binding	0.007	0.296	0.379	0.663

③ 三次スクリーニング

二次スクリーニングで陽性と判定したクローンについて、Jurkat 細胞（ヒト T 細胞リンフォーマ株）および ARH 77 細胞（ヒトミエローマ細胞株）を用いて増殖抑制実験を行った。Jurkat 細胞は 5×10^3 /ウェルで、ARH 77 細胞は 1×10^4 /ウェルの細胞数で 96 ウェルプレートに 100μ l で播種し、この細胞の浮遊液に上記のハイブリドーマ・クローンの培養上清を 5 ないし 10μ l 添加し、約 2 日間培養後 MTS により細胞数を測定した。対照として

は、10%FBSを含むIMDM培地および一次スクリーニングで陰性であったクローネン（8G2および9C5）の培養上清をそれぞれ5または10μlずつ添加した。

その結果は、11C8、7D2-E3（7D2のサブ・クローネン）、13F1、2F12の4クローネンを代表例として増殖抑制効果を図5、6に示した。

5 (4) 抗体の特性

① 11C8、7D2-E3、13F1、2F12の培養上清について、イムノグロブリンのタイプをELISA系を用いて検討した。

すなわち、ヒトIntegrin Associated Protein (IAP)を発現するCF-1細胞を96ウェルプレートに播種しELISAプレートを作製し上記の培養上清を50μl添加し、二次抗体としてはアルカリリフォラスファターゼでラベルした抗マウスIgG抗体（ザイメッド社製）および抗マウスIgM抗体（バイオソース社製）を反応させ、マイクロプレート・リーダーで測定した。その結果、11C8、7D2-E3はIgGであり、13F1、2F12はIgMであった。

② 上記の4クローネンの内11C8、7D2-E3の2クローネンについて、DNAの断片化をフローサイトメトリー（FACScan, ベクトン・ディッキンソン社製）でJurkat細胞、HL-60細胞を用い解析した。Jurkat細胞を用いては11C8および7D2-E3について、HL-60細胞を用いては11C8について検討した。

12ウェルのプレートに、Jurkat細胞およびHL-60細胞をそれぞれ4X10⁴/ウェル/2mlで播種し、7D2-E3および11C8の培養上清を200μlを添加し2日間培養後、測定に供した。対照としては、8G2の培養上清を同等量添加した。細胞を培養プレートより回収し200xgで細胞ペレットを2mlの冷70%エタノール中に4°Cで60分間固定した。次いで、細胞を遠心し、1mlのPBSで洗浄後、0.5mlのPBSで再懸濁した。この0.5mlの細胞サンプルに対して0.5mlのRNase (Type I-A, Sigma, St. Lo

u i s , M O , U S A , 1mg/ml i n P B S) を加え、次いで、1ml のヨウ化プロピジウム (PI, Sigma, 100 μ g/ml i n P B S) 溶液に混合した。混合した細胞は暗所で 37°Cで 60 分間インキュベーションした後、4°Cの暗所に保持し、フローサイトメトリーによる測定に供した。

5 その結果、図 7~9, 10~11 に示す様に、7D2-E3 および 11C8 の培養上清は、Jurkat 細胞に、11C8 の培養上清は HL-60 細胞に対しアポトーシスを起こしている細胞の比率を上昇させることが認められた。

③ 上記の 11C8 の培養上清について、ヒト骨髓間質細胞株 KM102 細胞フィーダーレイヤーとして HL-60 細胞との共培養系で、これらの培養上清が HL-60 細胞にアポトーシスを起こすか否かを検討した。

すなわち、2 ウエルの Lab-Tek Chamber Slide (ナルジエ ヌンク インターナショナル社製) に KM102 細胞を播種し sub-confluent の状態にし、この上に 1×10^6 個の HL-60 細胞を播種し約 1 日培養し、その後接着していない HL-60 細胞を除去し同時に上記の培養上清を最終濃度で 10% となるように添加し 2 日間培養した。培養後、細胞を 10% ホルマリンで固定し、TUNEL 法 (Apoptag Plus (Oncor 社製)) によりアポトーシスを起こしている HL-60 細胞を検出した。その結果、図 12, 13 に示す様に 11C8 の培養上清では、対照のヒト IAP と反応しないハイブリドーマクローンの培養上清 9C5 に比べアポトーシスになっている HL-60 細胞の数は増加していることが観察された。

(5) 抗体の精製

ハイブリドーマが産生する抗体の精製については、上記のハイブリドーマ株のうち、IgG を産生する 7D2-E3 および 11C8 のクローンの細胞株を、常法に従いプリスタン投与を施行した BALB/c/AnNCrj マウス (δ , 日本チャールズリバー社製) に腹腔内注入した。数週間後、産生された腹水を採取し産生される抗体を常法により分離し精製した。すなわち、得られた腹水はポロ

ス プロテインA プラスチックカラム（パーセプティブ・バイオシステム社製）で精製し、P B S（ダルベッコ社製）で透析し S D S – P A G E によりバンドの確認を行った。 図14に示すごとく、標品のマウス I g G（カペル社製）を対照として電気泳動を行うと、7 D 2 – E 3 および 1 1 C 8 のクローニーの I g G は、非還元条件、還元条件とともに、標品のマウス I g G と同一の位置にバンドが認められた。

上記の実施例においては、感作抗原として、前記ヒト I n t e g r i n A s s o c i a t e d P r o t e i n (I A P) を発現する L 1 2 1 0 細胞を使用した場合について例示したが、他のヒト I A P を発現する細胞あるいはヒト I A P そのものを使用した場合にも同様にしてモノクローナル抗体を作製すること、さらに、ファージ・ディスプレイ法を用いての抗体ライブラリーからのモノクローナル抗体の作製も可能であり、本発明は前記モノクローナル抗体に限らず、それと同様の特性を有するすべてのモノクローナル抗体、および当該モノクローナル抗体を産生するすべてのハイブリドーマを包含するものである。

さらに、上記のモノクローナル抗体の発明には、ヒト型化抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、プライマティズド抗体、さらに、抗体を各種酵素（パパイン、ペプシン、フィシン等）により消化した抗体の断片を含むものとする。

本発明のモノクローナル抗体の抗ヒト I n t e g r i n A s s o c i a t e d P r o t e i n (I A P) 抗体を産生するハイブリドーマは、D B A 系マウス脾細胞とマウス・ミエローマ細胞株 P 3 – U 1 を親細胞として作製された新規な融合細胞であり、公的微生物寄託機関である通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、1997年9月1日、抗 I A P 抗体（マウスハイブリドーマ 1 1 C 8 – F 8 (1 1 C 8 のサブクローニー) , M A B L – 1 と命名した）、受託番号 F E R M B P – 6 1 0 0 、抗 I A P 抗体（マウスハイブリドーマ 7 D 2 – E 3 (7 D 2 のサブクローニー) , M A B L – 2 と命名した）、受託番号 F E R M – B P – 6 1 0 1 として国際寄託

されている。

実施例2 (MABL-1、MABL-2抗体のサブクラス決定)

上で得られたMABL-1、およびMABL-2抗体のサブクラスを決定する目的で、100ng/mlに調製したMABL-1、およびMABL-2抗体500μlを、
ISOTYPING KIT(STRATAGENE社製)にスポットしたところ、MABL-1はIgG
G1、κであり、MABL-2はIgG2a、κであることが明らかとなった。

実施例3 (ヒトIAPを発現するヒト白血病細胞)

ヒトIAPを認識する抗CD47抗体(市販品を使用した)で各種ヒト白血病細胞株におけるIAPの発現をフローサイトメトリーで検索した。ヒトIAPはCD47と同一と考えられていることから(Biochem. J., 304, 525-530, 1994)、上記の抗体を検索に用いた。細胞株としては、Jurkat細胞、HL-60細胞、K562細胞、ARH77細胞、Raji細胞、CMK細胞を用いた。細胞は、 2×10^5 /サンプルとし、抗CD47抗体は最終濃度で5μg/mlで細胞とインキュベートし、二次抗体はFITC標識した抗マウスIgG抗体(ベクトン・ディッキンソン社製)を使用した。また、コントロールとしてはマウスIgG1抗体(ザイメント社製)を使用した。フローサイトメトリーの結果は、図15(HL-60)及び図16(Jurkat)に示され、いずれの細胞株もIAPを発現していることが明らかとなった。

実施例4 (in vitroでのアポトーシス効果)

(1) ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞、Jurkat細胞、HL-60細胞を用い、MABL-1およびMABL-2抗体のアポトーシス惹起作用をAnnexin-V(ベーリンガーマンハイム社製)により検討した。Annexin-Vによる解析の結果を図17~22にそれぞれ示した。ここで図の左下の領域にあるドットは生細胞を、右下の領域はアポトーシス細胞を、右上の領

域は壊死細胞を示す。抗体は対照としてマウス IgG（ザイメント社製）、MABL-1 および MABL-2 を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ で使用し、ヒト IAP を遺伝子導入した L1210 細胞では、 4×10^3 個の細胞で 72 時間、Jurkat 細胞では 6×10^4 個の細胞で 48 時間インキュベートした後、Annexin-V により解析した。その結果、図 17～22 に示す通り、細胞死が認められた。また、HL-60 細胞では、MABL-1 を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ で使用し、 1×10^5 個の細胞で Annexin-V により解析し、同様に細胞死が認められた。

(2) Fab 化した MABL-2 抗体について、ヒト IAP を遺伝子導入した L1210 細胞に対するアポトーシス惹起作用を検討した。すなわち、ヒト IAP を遺伝子導入した L1210 細胞を 4×10^3 個で培養し、抗体は Fab 化した MABL-2 およびその対照としてマウス IgG を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度で使用し、72 時間インキュベートした後、Annexin-V で測定した。その結果は、著しい細胞死が認められた（図 23、図 24）。MABL-2 抗体の Fab 化は、抗体をパパイン（ピアス社製）で消化し精製したものを実験に供した。Fab 化した MABL-2 抗体については、その SDS 電気泳動により確認認した（図 25）。

実施例 5 (in vivo でのアポトーシスの検討)

(1) MABL-1 および MABL-2 (Whole IgG) による薬効
ヒト IAP を発現する KPM-M2 細胞（ヒトミエローマ細胞株）を SCID マウスに移植し、移植後 10 日目に MABL-1 および MABL-2 (Whole IgG) をそれぞれ $5 \mu\text{g}/\text{head}$ 、 $50 \mu\text{g}/\text{head}$ ($n = 5$) を単回静脈内投与し、KPM-M2 移植後 28 日目に血中 IgG 濃度を ELISA にて測定した結果、消失したことが確認された。さらに生存期間についても検討した。その結果、MABL-1 および MABL-2 を処置した群では、血中ヒト IgG 濃度については顕著な抑制が見られ殺腫瘍効果を示した（図 30）。さらに生存期間も顕著に延長したことがわかる（図 26）。

(2) M A L B - 1 および M A L B - 2 (F (a b') 2) による 薬 効

M A L B - 1 および M A L B - 2 抗体をペプシンにより消化しプロテインAにより精製(ピアス社製)した F (a b') 2 を用い、 F c 領域を介した細胞障害作用を除外した殺腫瘍効果を検討した。すなわち、ヒト I A P を発現する K P M M 5 2 細胞(ヒトミエローマ細胞株)を S C I D マウスに移植し、 F (a b') 2 化した M A B L - 1 および M A B L - 2 の 1 0 0 μ g / head 投与群では、移植後 6 日目、 1 0 日目に、 1 0 および 3 0 μ g / head 投与群では投与後 6 、 8 、 1 0 日目に静脈内投与し、血中 I g G 濃度を移植後 3 0 日目に E L I S A にて測定した(図 2 7)。さらに、生存期間についても移植後 9 0 日まで検討した。その結果、 10 M A B L - 1 および M A B L - 2 を処置した群では、血中ヒト I g G 濃度については顕著な抑制効果が認められ、殺腫瘍効果を示した。さらに生存期間も顕著に延長したことがわかる(図 2 8)。なお、 F (a b') 2 化した M A B L - 1 抗体、及び M A B L - 2 抗体の S D S 電気泳動写真を図 2 9 に示す。

産業上の利用可能性

15 本発明のモノクローナル抗体は、ヒト I n t e g r i n A s s o c i a t e d P r o t e i n を特異的に認識する抗体であり、ヒト I n t e g r i n A s s o c i a t e d P r o t e i n を有する有核血液細胞にアポトーシスを引き起こす抗原である。従って、ヒト I n t e g r i n A s s o c i a t e d P r o t e i n を特異的に認識する抗体として、これらを識別、同定するのに有用であると共に、有核血液細胞にアポトーシスを引き起こす作用を有することから、当該特性を利用して、骨髄性白血病およびリンパ系白血病の治療等の分野において有用な治療薬剤等として使用し得るものである。

請求の範囲

1. Integrin Associated Protein (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシス (apoptosis) を誘起するモノクローナル抗体。
- 5 2. Integrin Associated Protein (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシス (apoptosis) を誘起するモノクローナル抗体断片、ペプチド、および低分子化合物。
3. 請求項 1 記載のモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ。
4. IAP に結合して IAP の作用を亢進させ、有核血液細胞にアポトーシスを誘起する物質を含有する抗白血病治療剤。
- 10 5. 請求項 4 の物質がモノクローナル抗体であることを特徴とする抗白血病治療剤。
6. 請求項 4 の物質がモノクローナル抗体断片、ペプチド、低分子化合物であることを特徴とする抗白血病治療剤。

図 1

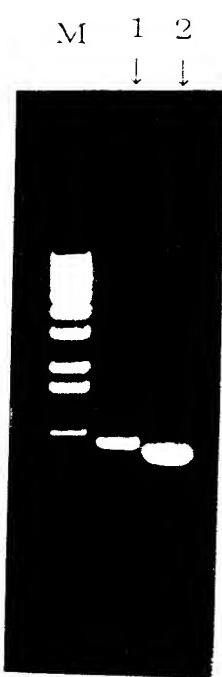


図 2

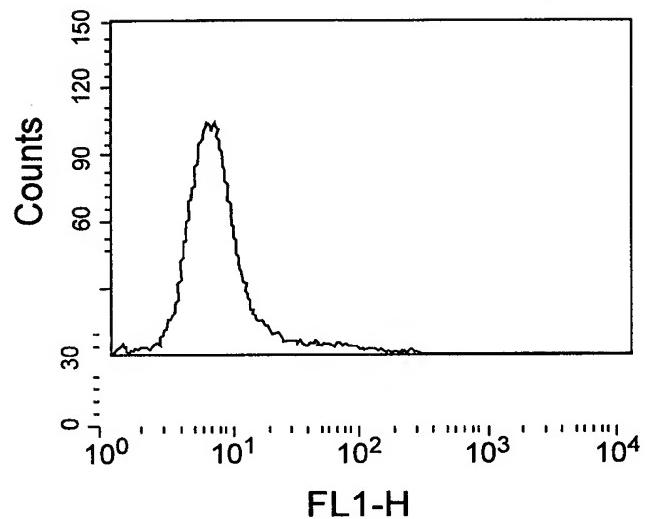
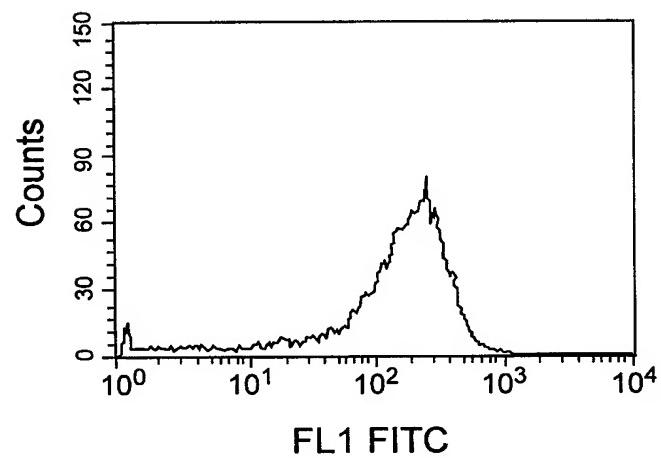


図 3



☒ 4

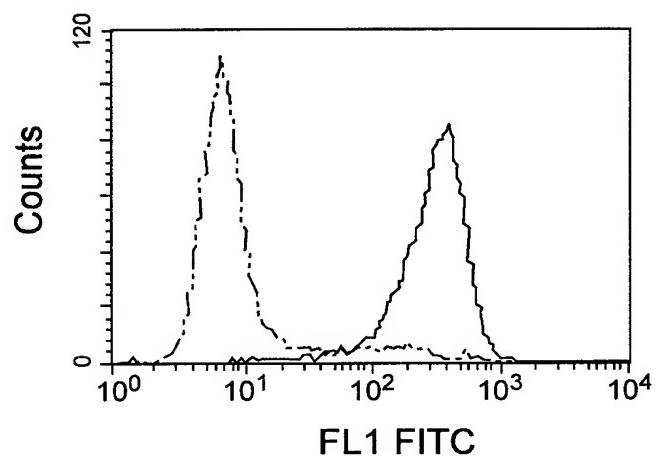


図 5

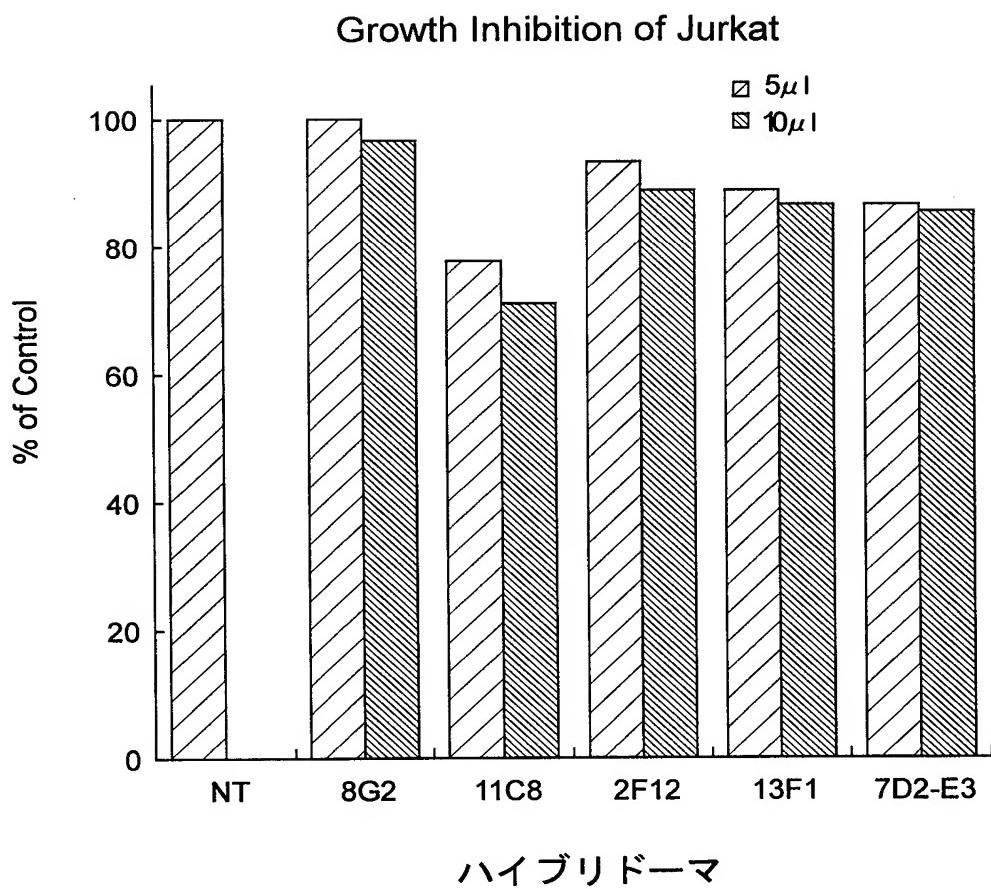


図 6

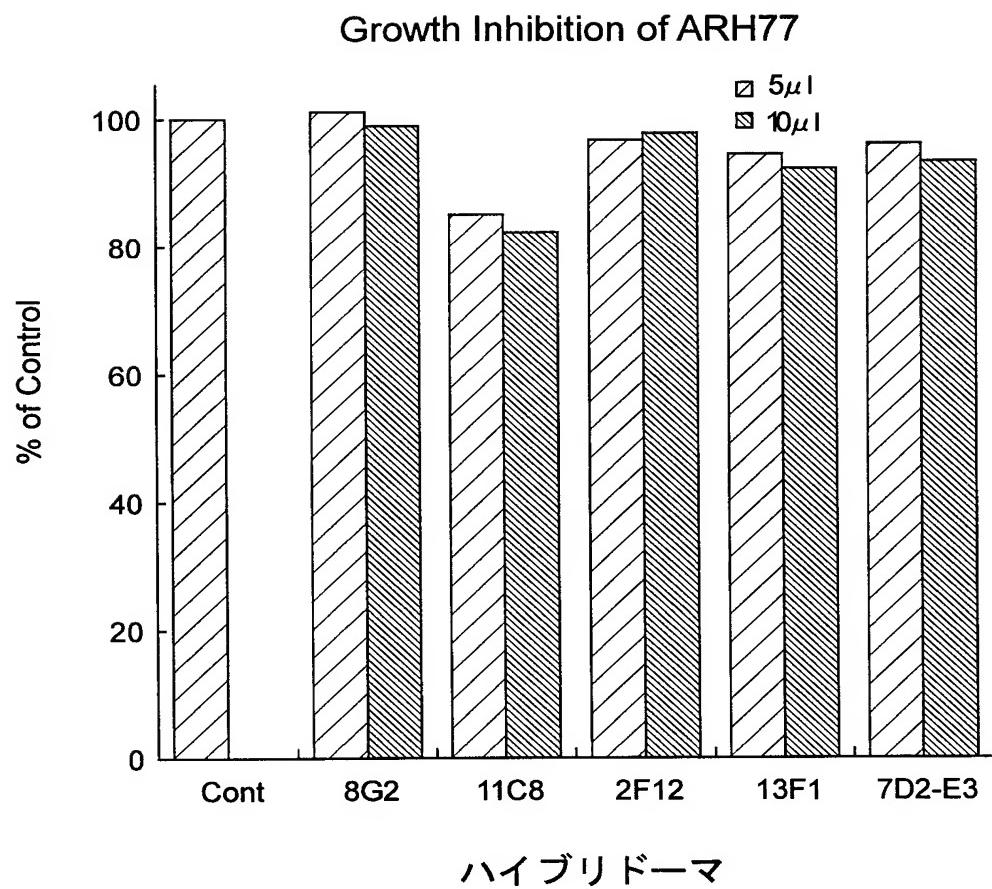


図 7

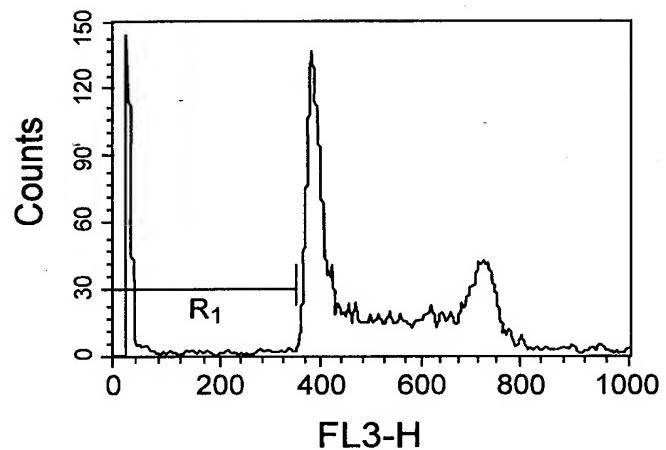


図 8

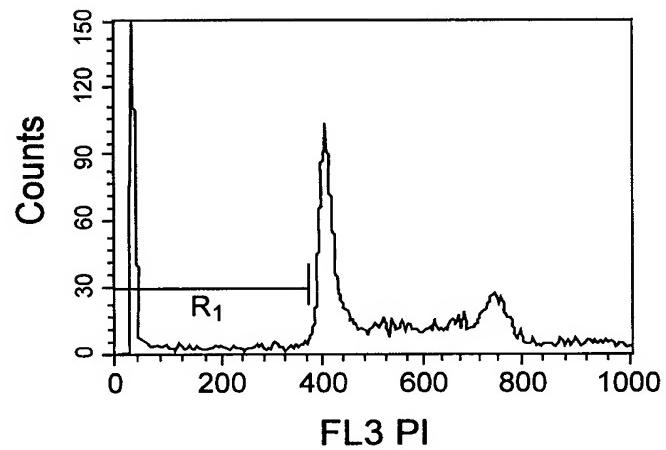
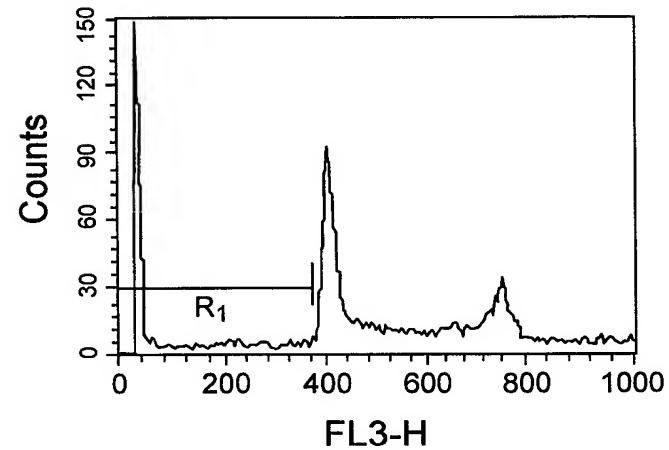
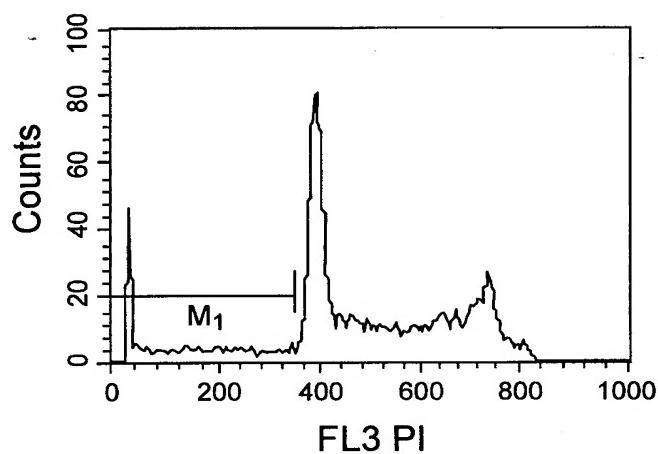


図 9



☒ 10



☒ 11

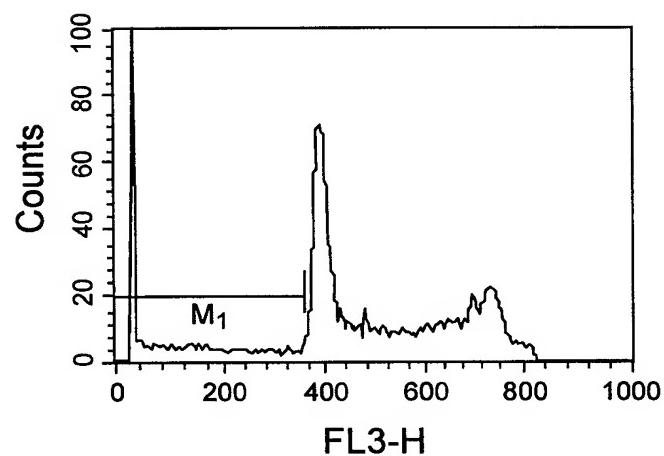


図12A



図12B

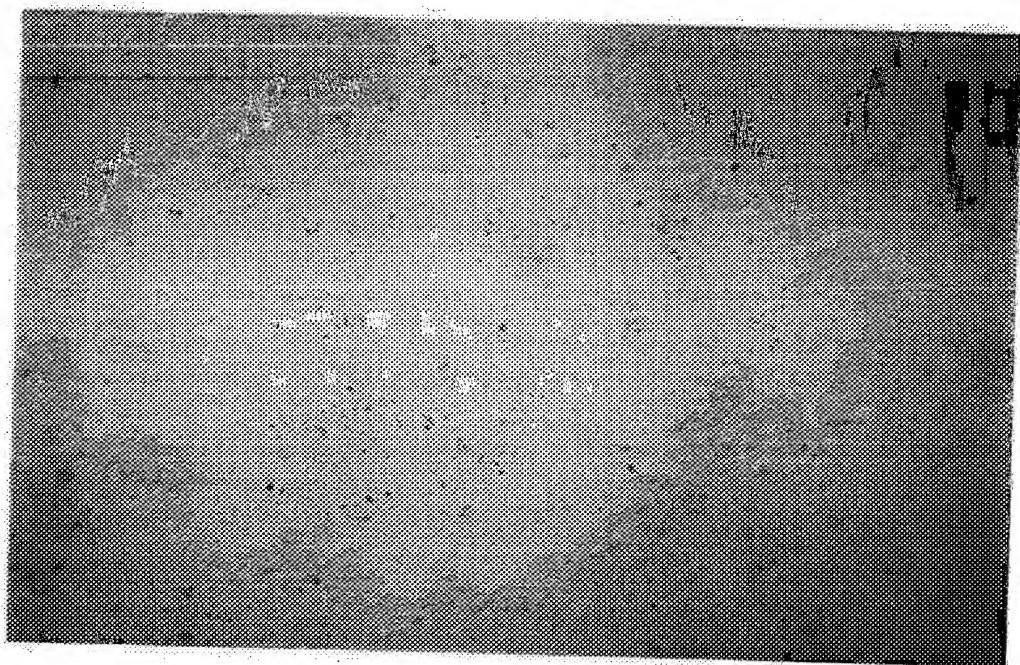


図13A



図13B

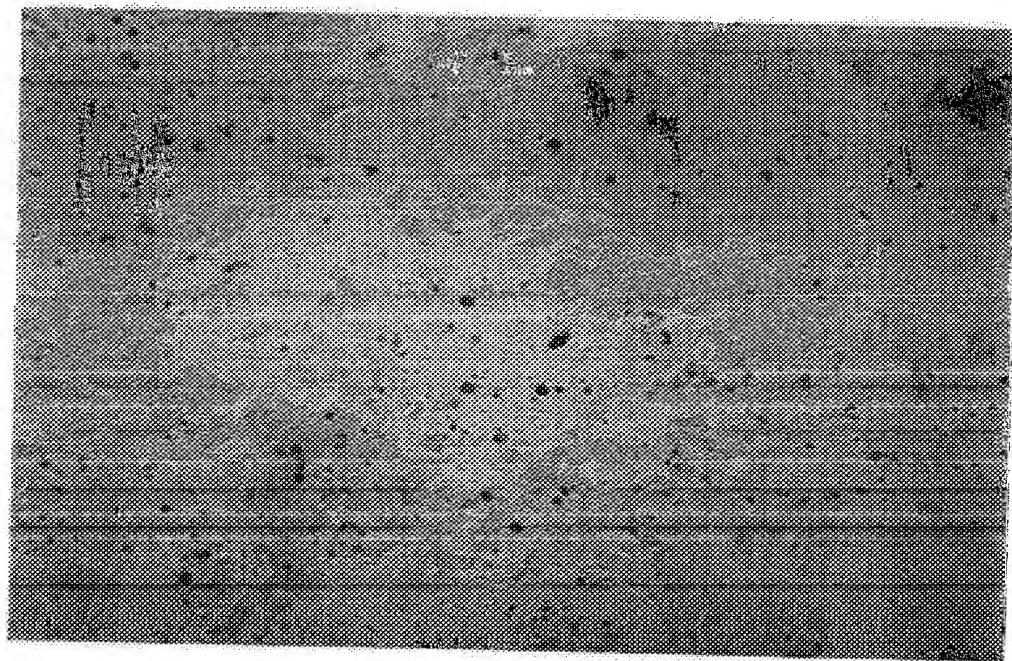


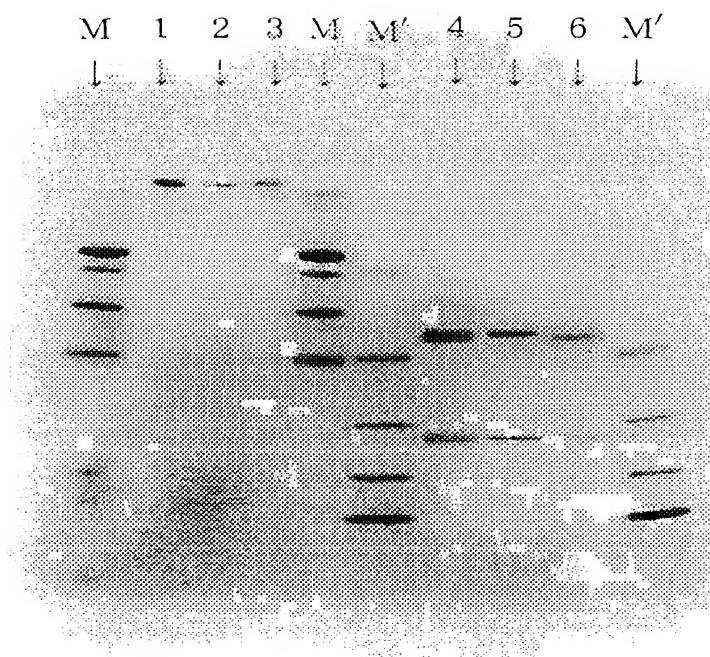
図14

図15

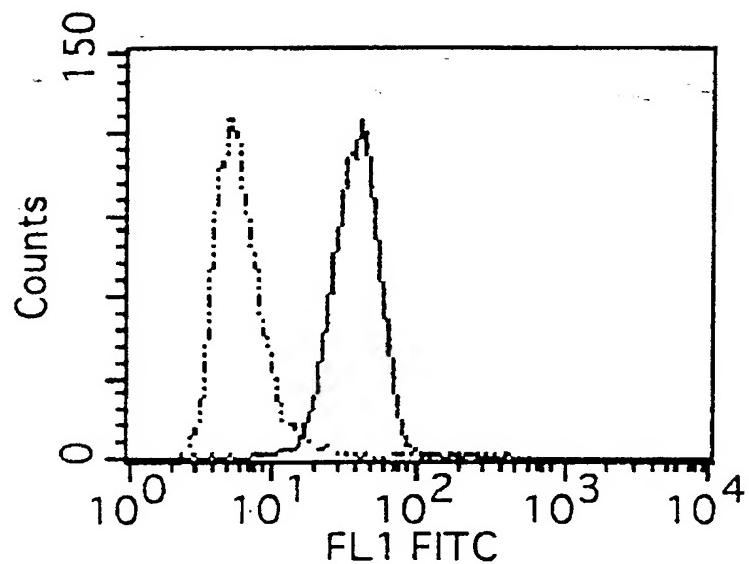


図16

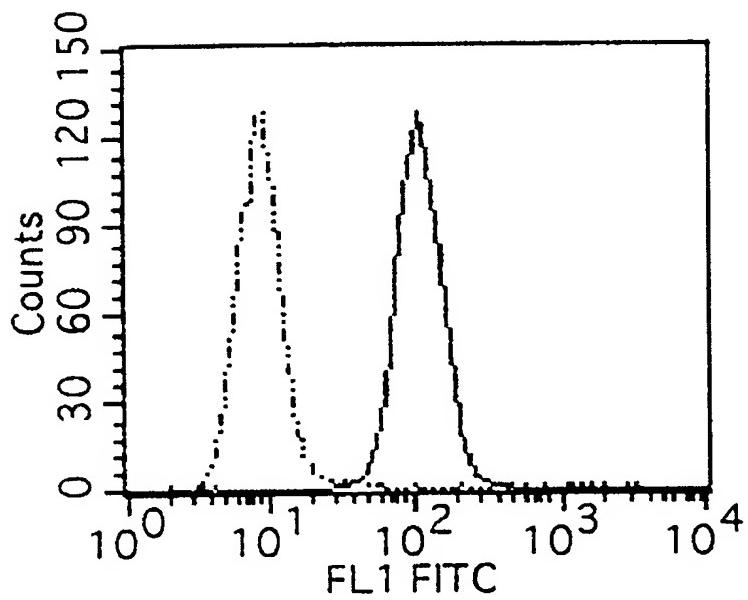


図17

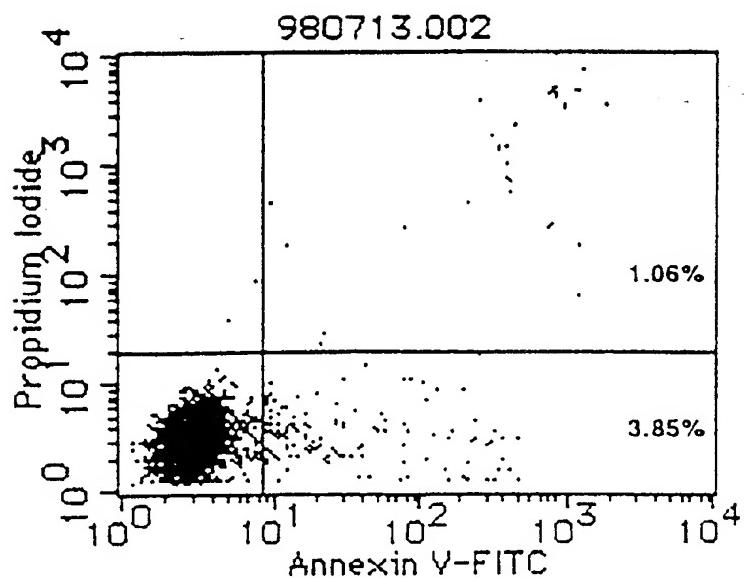


図18

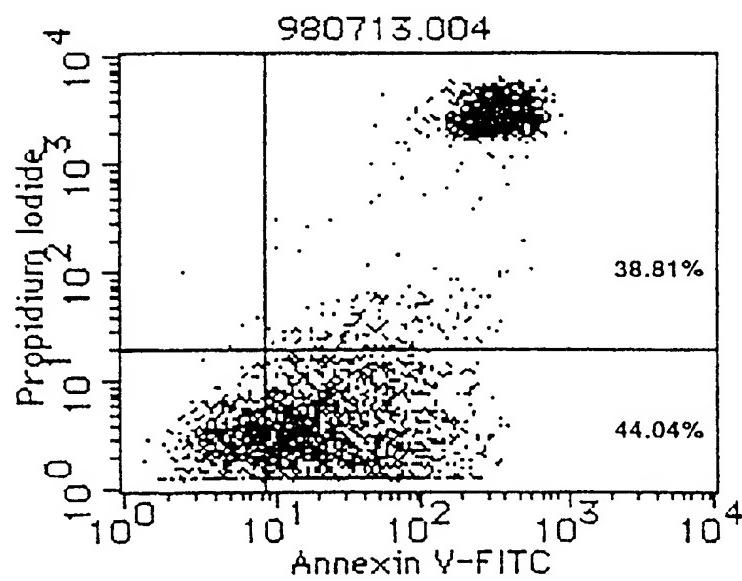


図19

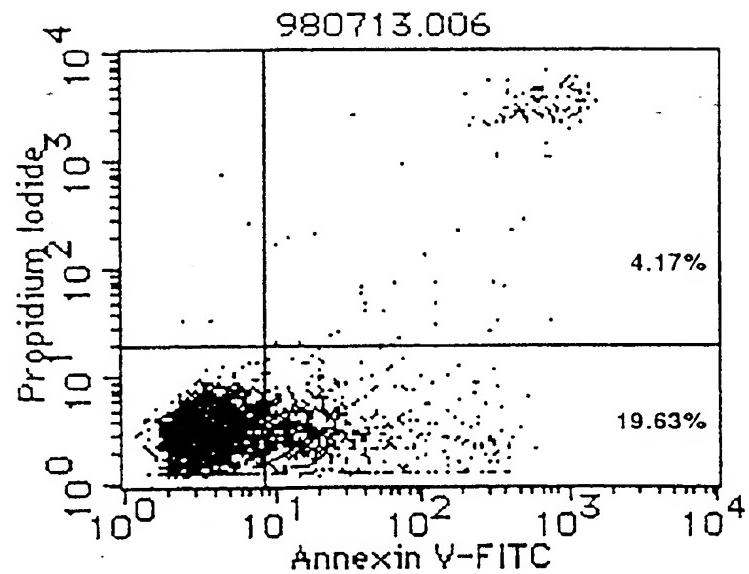
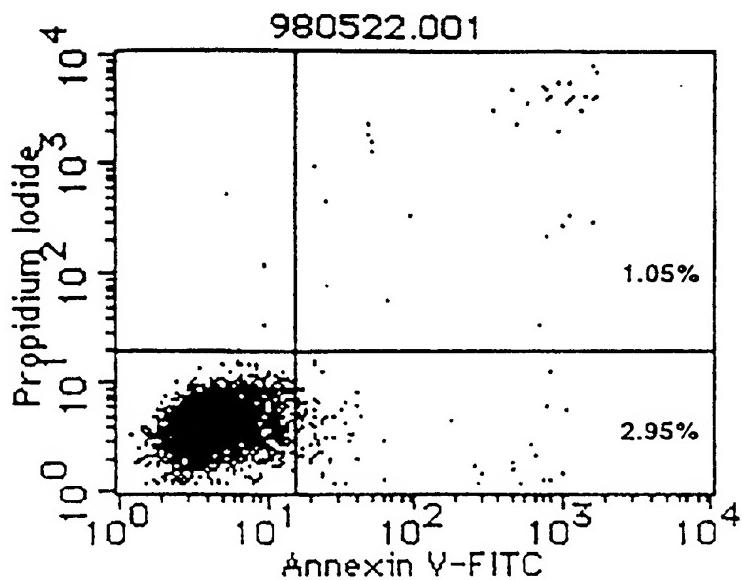
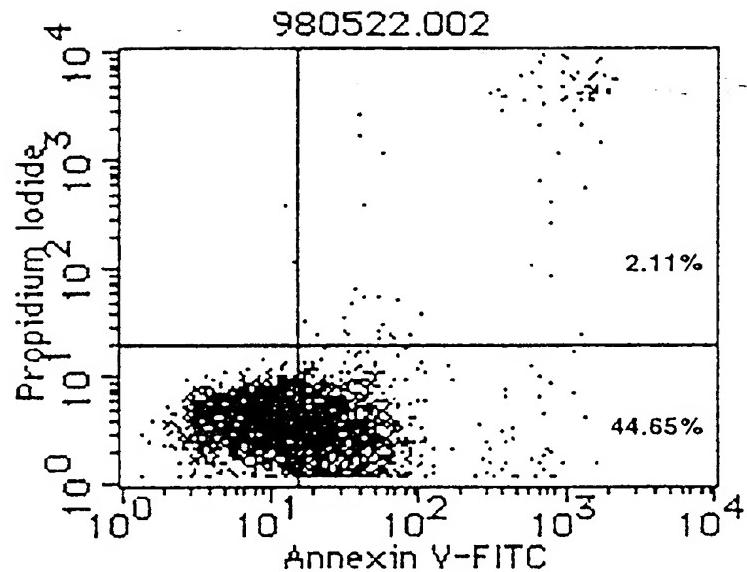


図20



☒ 21



☒ 22

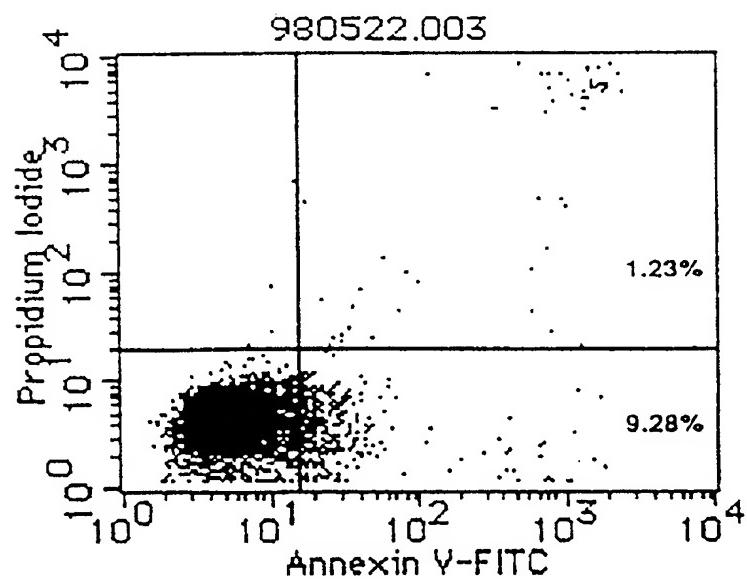


図23

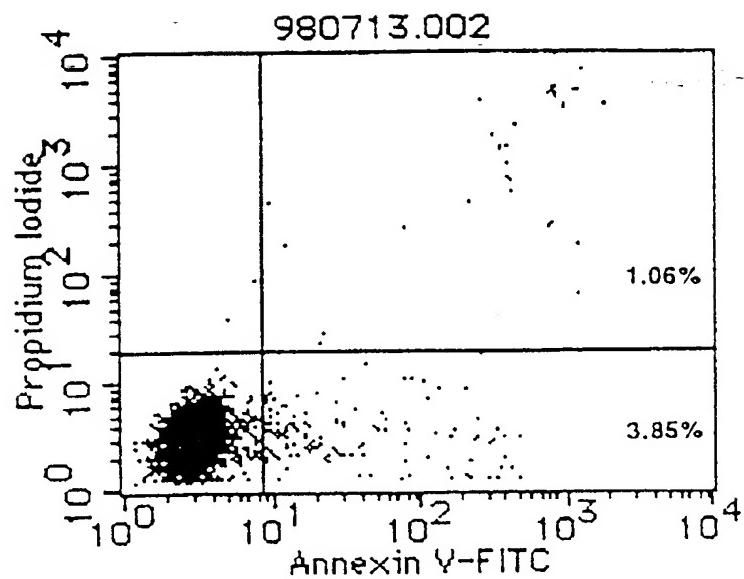


図24

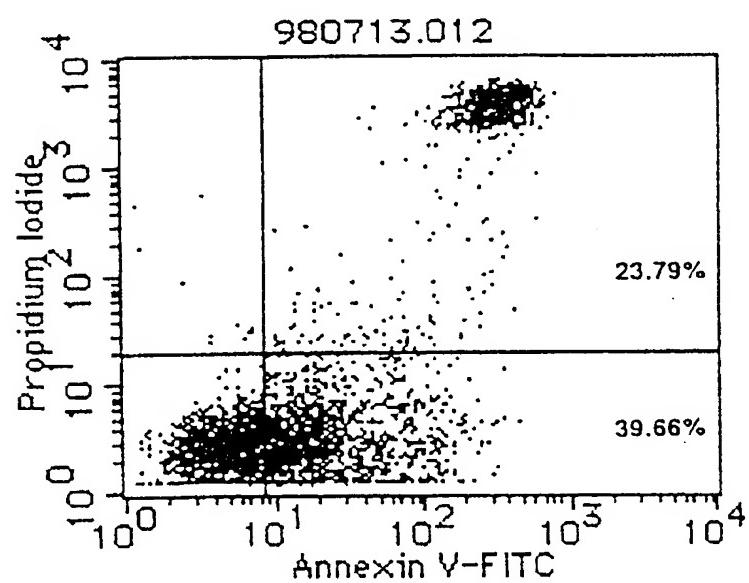


図25

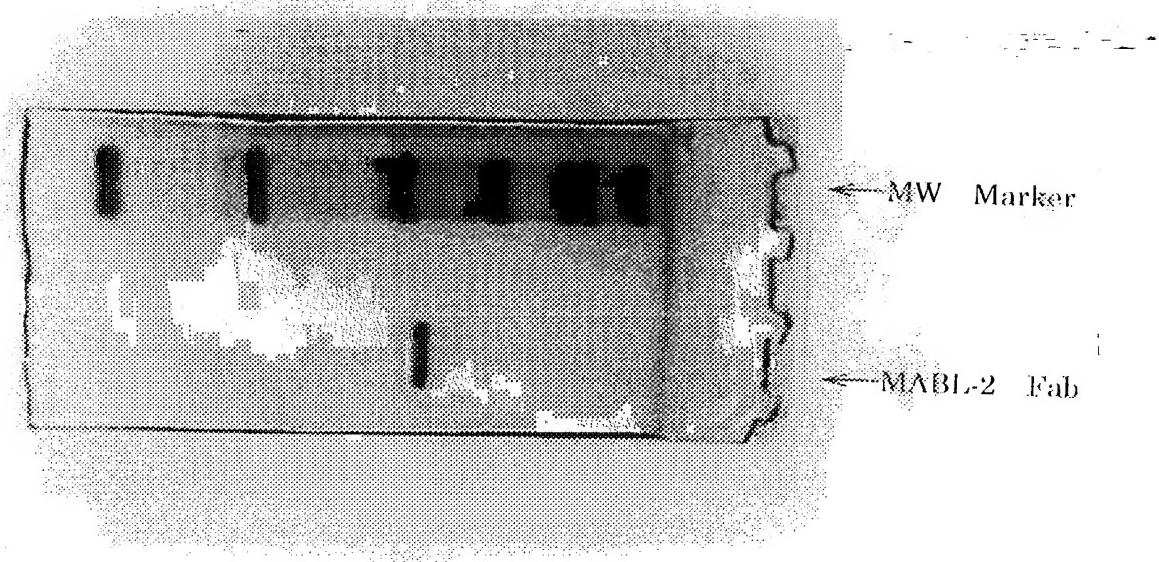


図26

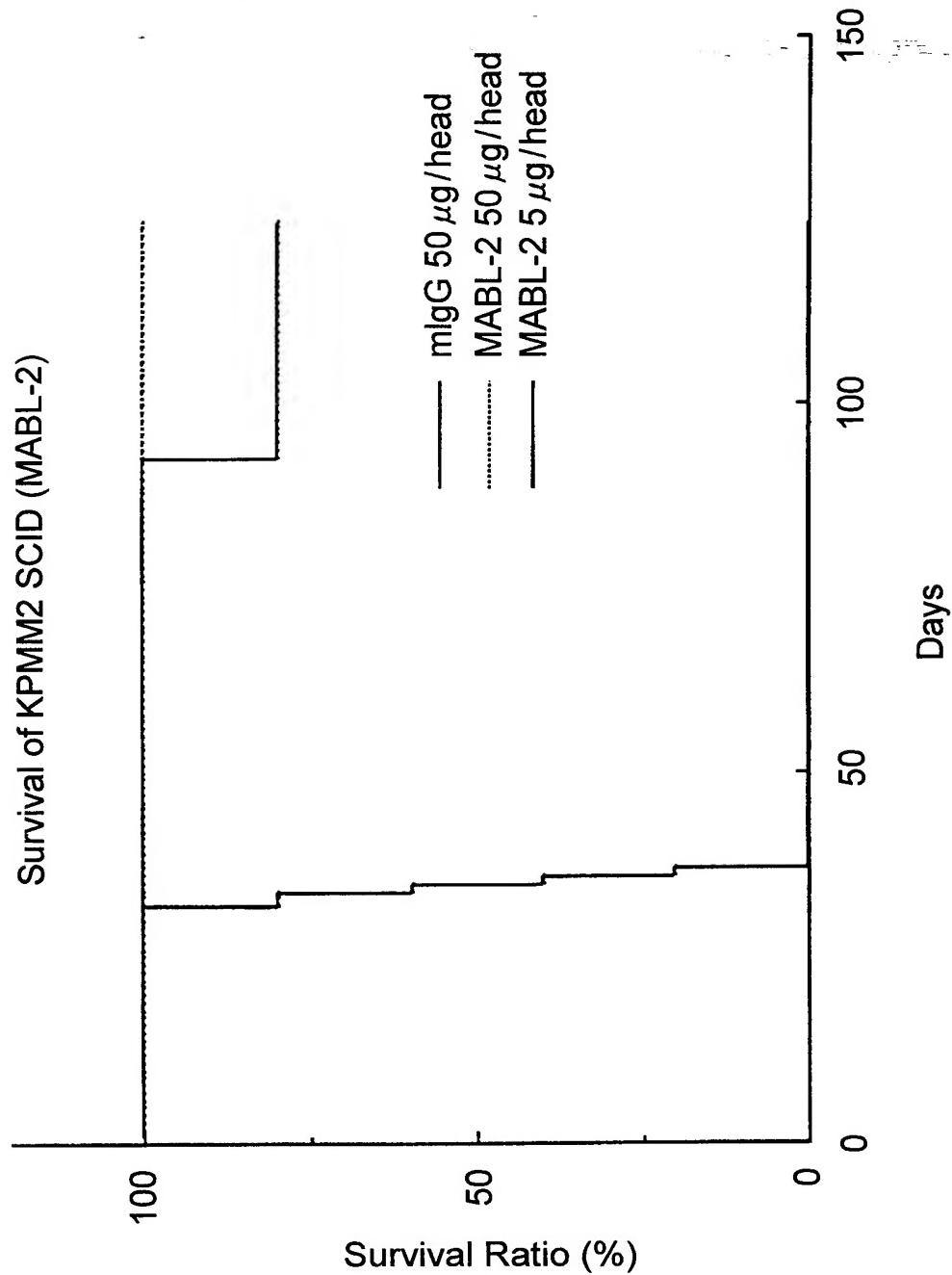


図27

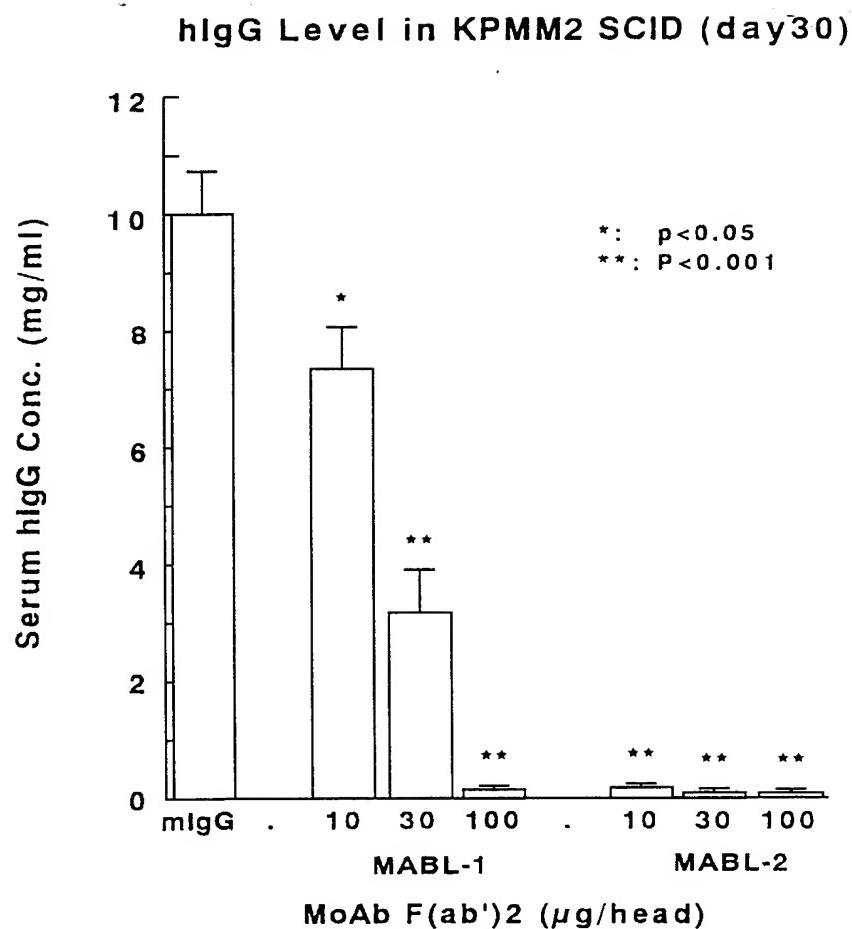


图28

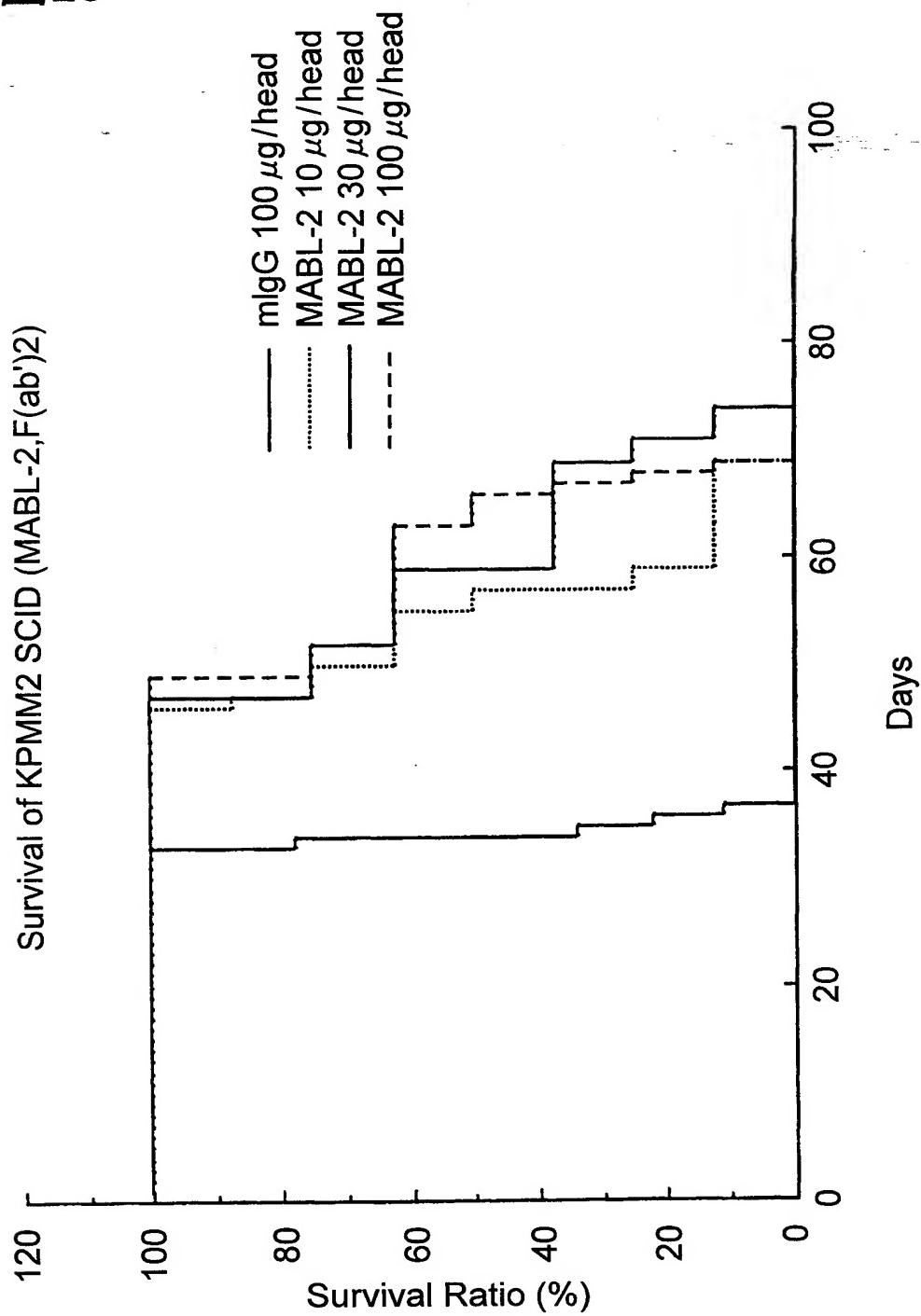


図29

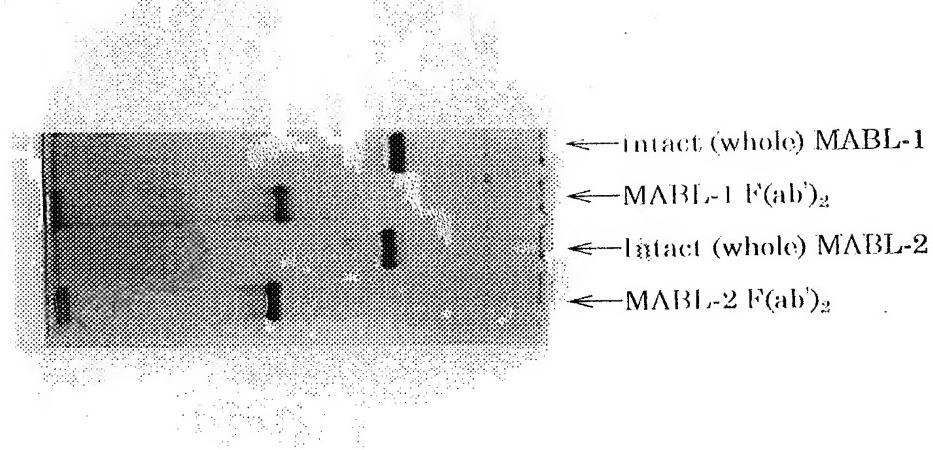
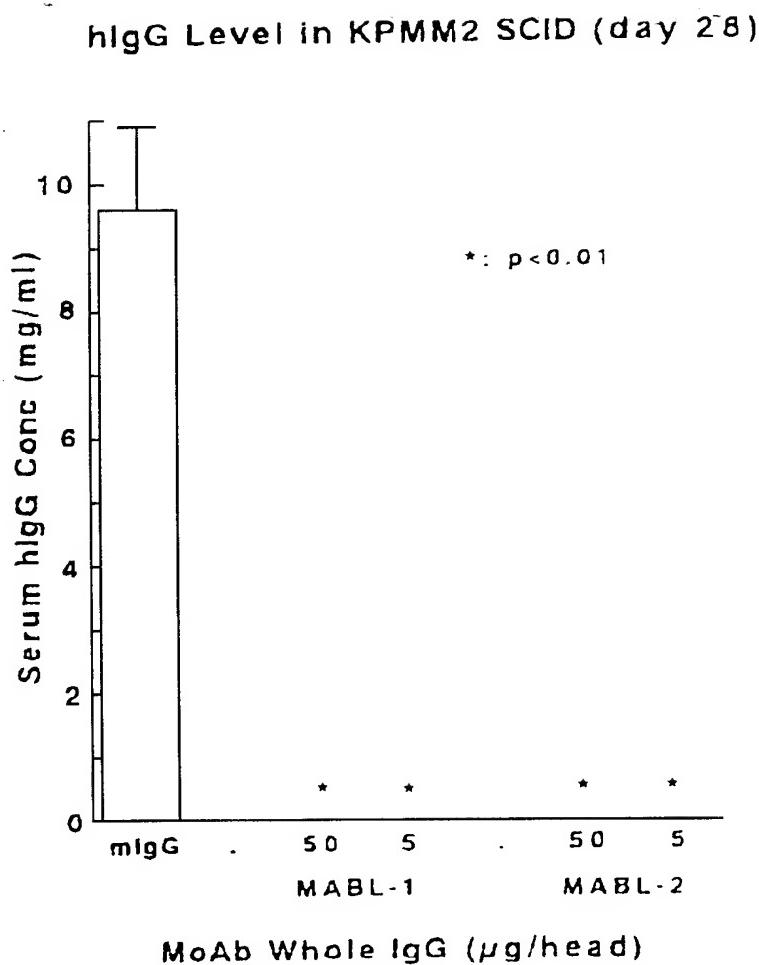


図30



配列表

SEQUENCE LISTING

5 <110>CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120>Monoclonal antibody inducing apoptosis

<130>CGS98-03PCT

10

<160>2

<210>1

<211>26

15 <212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>PCR primer

20

<400>1

GCAAGCTTAT GTGGCCCTG GTAGCG 26

<210>2

25 <211>26

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

5 <230>PCR primer

<400>2

GCGGCCGCTC AGTTATTCCCT AGGAGGG 26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04118

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07K16/18, C07K16/28, C12N5/20, A61K39/395 // C12P21/08,
C12N15/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07K16/18, C07K16/28, C12N5/20, A61K39/395, C12P21/08,
C12N15/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO, 97/32601, A1 (CHUGAI SEIYAKU KK), 12 September, 1997 (12. 09. 97) & JP, 9-295999, A & AU, 9722325, A	1-6
A	Journal of Cell Science vol. 108, No. 11 (1995) Martina I. Reinhold et al., "In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47)" p3419-3425	1-6

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search
11 December, 1998 (11. 12. 98)

Date of mailing of the international search report
22 December, 1998 (22. 12. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/04118

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C 07K 16/18, C 07K 16/28, C 12N 5/20, A 61K 39/395
 //C 12P 21/08, C 12N 15/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C 07K 16/18, C 07K 16/28, C 12N 5/20, A 61K 39/395,
 C 12P 21/08, C 12N 15/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 97/32601, A1 (CHUGAI SEIYAKU KK) 12. 9月. 1997 (12.09.97) & JP, 9-295999, A & AU, 9722325, A	1-6
A	Journal of Cell Science vol. 108 No. 11 (1995) Martina I. Reinhold et al. "In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47)" p3419-3425	1-6

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリ文献

国際調査を完了した日 11.12.98	国際調査報告の発送日 22.12.98
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 小暮 道明 4B 9358 

電話番号 03-3581-1101 内線 3449